

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Ana-Marija Jarmek

Fitokelatini: struktura, sinteza i funkcija

Završni rad

Osijek, 2018. godine

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Biologija

FITOKELATINI: STRUKTURA, SINTEZA I FUNKCIJA

Ana-Marija Jarmek

Rad je izrađen na: Zavod za biokemiju i ekofiziologiju biljaka

Mentor: dr.sc. Rosemary Vuković, docent

Kratak sažetak završnog rada: Teški metali u biljkama uzrokuju oksidacijski stres koji uništava biljnu stanicu. Biljke akumuliraju teške metale koji narušavaju unutarstaničnu ionsku homeostazu. Za smanjenje negativnog učinka teških metala razvile su mehanizme obrane. Glavnu ulogu u tome imaju fitokelatini, peptidi bogati cisteinom koji se sintetiziraju iz preteče glutaciona pomoću enzima fitokelatin-sintaze. Sinteza fitokelatina ovisi o vrsti i koncentraciji teških metala te vrsti i uvjetima uzgoja biljke. U biljci se prisutnost fitokelatina može odrediti metodama visokotlačne tekućinske kromatografije i Western blot metode.

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: glutation, fitokelatin sintaza, teški metali, visokotlačna tekućinska kromatografija, Western blot metoda

Rad je pohranjen: ne mrežnim stranicama Odjela za biologiju te u Nacionalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice u Zagrebu

BASIC DOCUMENTATION CARD**Bachelor thesis****Josip Juraj Strossmayer University of Osijek****Department of Biology****Undergraduate university study programme in Biology****Scientific Area:** Natural sciences**Scientific Field:** Biology**PHYTOCHELATINS: STRUCTURE, SYNTHESIS AND FUNCTION**

Ana-Marija Jarmek

Thesis performed at: Subdepartment of plant ecophysiology and biochemistry**Supervisor:** Rosemary Vuković, PhD, Asst. Prof.

Short abstract: Heavy metals in plants cause oxidative stress that leads to cellular damage. Plants accumulate heavy metals that disrupt intracellular ionic homeostasis. To reduce the negative impact of heavy metals, they have developed defense mechanisms. The main role in this have phytochelatins, peptides rich with cysteine, which are synthesized from the glutathione precursor by the phytochelatase enzyme. The synthesis of phytochelatase depends on the type and concentration of heavy metals and the type and conditions of plant breeding. The presence of phytochelatase in plants can be determined with the high pressure liquid chromatography method and western blot method.

Original in: Croatian

Key words: glutathione, phytochelatase, heavy metals, visokotlačna tekućinska kromatografija, method Western blot

Thesis deposited: on the Department of Biology website and the Croatian Digital Theses Repository of the National and University Library in Zagreb.

POPIS KRATICA:

Ala – alanin

As – arsen

Cd - kadmij

Cu – bakar

Cys – cistein

DTNB – 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzojeva kiselina)

Glu – glutamat

Gly – glicin

GSH – glutation

GSH1 – γ – glutamilcistein sintaza

GSH2 – glutation sintetaza

h-PC – homo-fitokelatini

He – helij

Hg – živa

HPLC – visokotlačna tekućinska kromatografija

mBBBr - 3,7-dimetil-4-bromometil-6-metil-1,5-diazabiciklo-(3,3,3)-okta-3,6-dien-2,8-dion

Met – metionin

Mg – magnezij

Ni – nikal

Pb – olovo

PC – fitokelatini

PCS – fitokelatin sintaza

S – sumpor

Ser – serin

Zn – cink

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
2. STRUKTURA FITOKELATINA	2
3. SINTEZA FITOKELATINA	3
3.2. REGULACIJA SINTEZE FITOKELATINA	5
3.3. ČIMBENICI KOJI UTJEČU NA SINTEZU FITOKELATINA	6
3.3.1. VRSTE TEŠKIH METALA	6
3.3.2. KONCENTRACIJA TEŠKIH METALA	7
3.3.3 VRSTA I UVJETI UZGOJA BILJKE	7
4. FUNKCIJA FITOKELATINA.....	8
4.1. POVEĆANJE OTPORNOSTI BILJAKA NA TEŠKE METALE I DETOKSIKACIJA TEŠKIH METALA	8
4.3. ULOGA FITOKELATINA U METABOLIZMU SUMPORA TIJEKOM STRESA UZROKOVANOG TEŠKIM METALIMA	10
5. METODE ODREĐIVANJA FITOKELATINA	11
5.1. VISOKOTLAČNA TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA	11
5.2. WESTERN BLOT ANALIZA FITOKELATIN-SINTAZE	13
6. ZAKLJUČAK.....	15
7. LITERATURA	16

1. UVOD

Povećanje koncentracije teških metala u okolišu predstavlja značajni problem za sve žive organizme. Kontaminacija tla teškim metalima drastično se povećala u prošlom stoljeću uslijed rudarstva, metalurgije, te izmjene poljoprivrednih tala odlaganjem komunalnog otpada (Liu i sur. 2015). Za razliku od organskih tvari, teški se metali ne mogu razgraditi prirodnim putem ili pomoću mikrobioloških zajednica, te je upravo to razlog njihovog dugoročnog zadržavanja u tlu (Zhou i Song 2004).

Mnogi teški metali su esencijalni za biljne fiziološke procese, kao na primjer bakar (Cu), cink (Zn), magnezij (Mg) i nikal (Ni). Međutim, postoje i neesencijalni teški metali kao što su kadmij (Cd), olovo (Pb) i živa (Hg). Prekomjerne količine esencijalnih metala, kao i male količine neesencijalnih metala mogu biti toksične za biljke. Primarni odgovor biljaka na visoke razine teških metala je prekomjerno stvaranje reaktivnih kisikovih tvari (ROS), kao što su vodikov peroksid (H_2O_2), superoksidni ($\bullet O_2^-$) i hidroksilni ($\bullet OH$) radikal. Tako, toksične koncentracije teških metala, uslijed povećane sinteze ROS-a, mogu inducirati oksidacijski stres kod biljaka (Liu i sur. 2015).

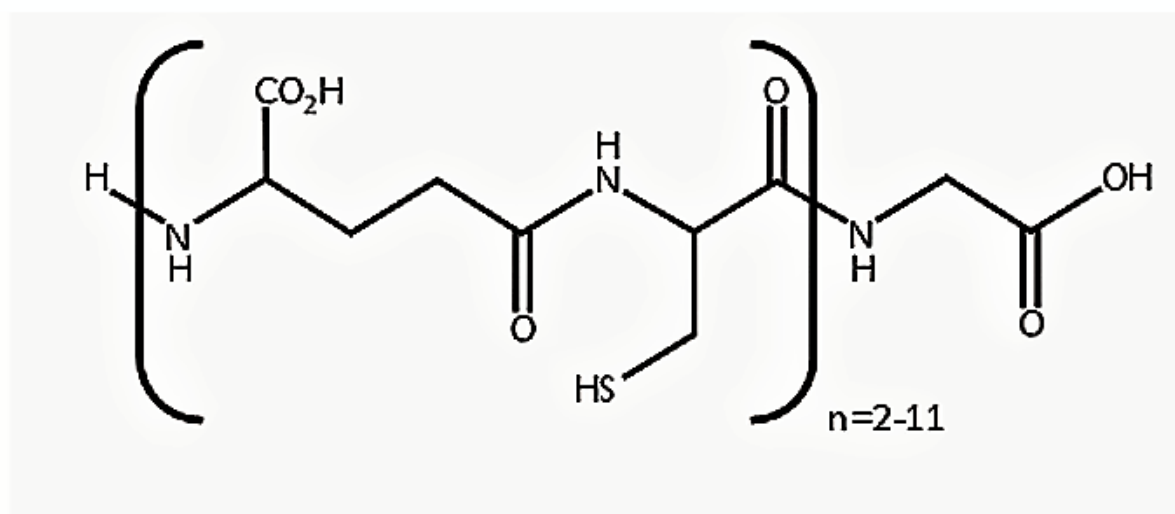
Mnogi organizmi razvili su mehanizme otpornosti ili barem djelomične otpornosti na uvjete prekomjerne koncentracije teških metala u okolišu. Pomoću tih mehanizama organizmi održavaju koncentraciju esencijalnih metala većom od koncentracije neesencijalnih metala, koju ujedno održavaju i ispod praga toksičnosti. Više biljke, alge, te pojedini kvasci i životinje proizvode metabolite koji se vežu na teške metale u citosolu, kao što su glutation (GSH), različiti polipeptidi i proteini, te metalotioneini i fitokelatini (PC).

PC su porodica enzimski sintetiziranih peptida bogatih cisteinom (Cys). Prvotno su metalotioneini pronađeni u životinjama, te se smatralo kako su PC svojom funkcijom analozi metalotioneina u biljkama. PC su tijekom godina dobivali različite nazive, ali je termin „fitokelatini“ ostao najprihvaćeniji naziv. Međutim, termin „fitokelatini“ nije dovoljno precizan budući su PC prvotno pronađeni u kvascu *Schizosaccharomyces pombe*, a danas je poznato i da neke životinje, također, imaju gene za fitokelatin-sintazu (PCS), enzim odgovoran za sintezu fitokelatina. Ipak, termin služi za razlikovanje jednih od tipova spojeva koji na sebe vežu teške metale, te nema razloga za promjenu naziva (Cobbett i Goldsbrough 2002).

2. STRUKTURA FITOKELATINA

Peptid je prvo otkriven kao kompleks s Cd, nakon izlaganja vinskog kvasca *Schizosaccharomyces pombe* ionima Cd, te su takvi kompleksi nazvani „kadistinima“ (Murasugi i sur. 1981). Kondo i suradnici su (1984) iz kulture biljnih stanica u suspenziji izolirali nove peptidne komplekse teških metala. Ti peptidi nazvani su „fitokelatinima“, a pojavljuju se nakon indukcije biljnih stanica teškim metalima te im je glavna funkcija u stanicama vezanje metala. Osim nakon izlaganja Cd, PC se mogu sintetizirati i nakon izlaganja drugim teškim metalima kao što su Hg, Cu, Zn, Pb i Ni (Liu i sur. 2015).

Fitokelatini su peptidi bogati Cys, koje čine aminokiseline glutamat (Glu), Cys i glicina (Gly) (Merlos i sur. 2014). Postoji pet porodica peptida γ -Glu-Cys, koje pokazuju zajedničke strukturne značajke. Zajedničko svim porodicama je da se sastoje od aminokiseline Glu, koja zauzima amino-terminalni položaj, sljedeći ostatak je aminokiselina Cys koja je povezana peptidnom vezom s γ -karboksilnim krajem Glu. Takve dipeptidne jedinice γ -Glu-Cys ponavljaju se više puta, uglavnom dva do jedanaest puta, a točan broj ponavljanja označava se indeksom n (Rauser 1995). Na karboksi-terminalnom kraju peptida $(\gamma$ -Glu-Cys) n nalazi se uglavnom aminokiselina Gly. Opća struktura PC je $(\gamma$ -Glu-Cys) n -Gly, gdje se dipeptid γ -Glu-Cys najčešće ponavlja do pet puta (Slika 1.). Osim Gly, na karboksi-terminalnom kraju peptida $(\gamma$ -Glu-Cys) n mogu se naći i drugi aminokiselinski ostaci, kao što su serin (Ser), Glu, glutamin (Gln) i alanin (Ala) (Merlos i sur. 2014). Takvi peptidi kemijskom analizom identificirani su kao homolozi PC-a te se nazivaju homo-fitokelatinima (h-PC) (Tablica 1.) (Liu i sur. 2015).



Slika 1. Opća struktura fitokelatina (preuzeto od Merlos i sur. 2014)

Tablica 1. Vrste fitokelatina (PC) i homo-fitokelatina (h-PC) u biljkama (preuzeto od Liu i sur. 2015).

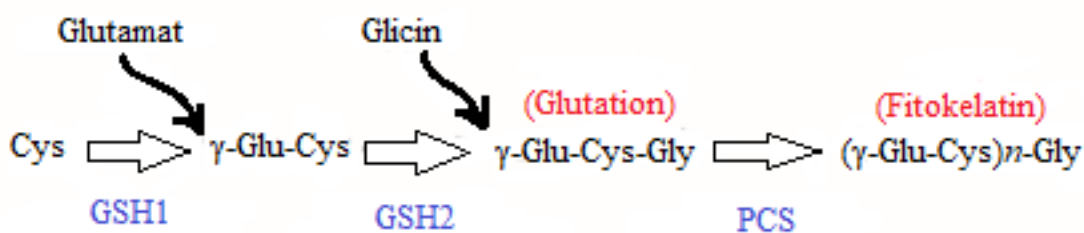
PC i h-PC	BILJNA VRSTA
$(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$	<i>Rauwolfia serpentina, Lycopersicon Esculentum</i>
$(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-}\beta\text{-Ala}$	<i>Glycine max, Pisum sativum L.</i>
$(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Ser}$	<i>Oryza sativa L. cv Stella</i>
$(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Glu}$	<i>Zea mays L.</i>
$(\gamma\text{-Glu-Cys})_n$	<i>Armoracia rusticana</i>

3. SINTEZA FITOKELATINA

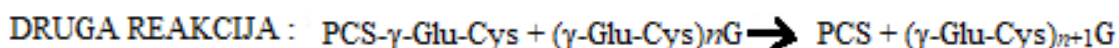
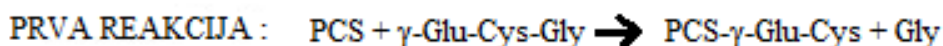
Biljke mogu razviti vrlo učinkovit mehanizam kako bi se zaštitile od toksičnosti teškim metalima. Tako, biljke proizvode tiole male molekularne mase koji pokazuju visoki afinitet za toksične metale, kao što je tripeptidni GSH. Steffens (1990) je prvi predložio GSH kao preteču za sintezu PC-a. Istraživanje koje je rađeno na uročnjaku (*Arabidopsis*) pokazalo je kako je put sinteze PC-a povezan s sintezom GSH. U navedenom je istraživanju uobičajena koncentracija GSH u biljkama modificirana ekspresijom transgena za γ -glutamylcistein-sintazu (*GSH1*), prvog enzima biosintetskog puta GSH, te su kao rezultat transgene biljke uročnjaka imale razinu GSH u rasponu od 3 do 200% veću u odnosu na biljke divljeg tipa. Transgene biljke uročnjaka, s niskom razinom GSH, bile su osjetljivije na Cd zbog ograničenog kapaciteta sinteze PC-a (Xiang i sur. 2001).

Put biosinteze PC-a sastoji se od dvije faze (Slika 2.). U prvoj fazi, enzim γ -glutamylcistein-sintaza (*GSH1*) katalizira stvaranje peptidne veze između γ -karboksilne skupine Glu i amino-skupine Cys čime nastaje dipeptid γ -glutamylcistein ($\gamma\text{-Glu-Cys}$; $\gamma\text{-EC}$). Zatim enzim glutathion-sintaza (*GSH2*) katalizira povezivanje karboksilne skupine $\gamma\text{-Glu-Cys}$ i amino-skupine Gly, pri čemu nastaje GSH ($\gamma\text{-Glu-Cys-Gly}$) (Liu i sur. 2015). U toj fazi *GSH1* je najvažnija sintaza za nastanak GSH, čija se aktivnost povećava prisutnošću metalnih iona, poput iona Cd. U ovoj fazi potreban je utrošak ATP-a za odvijanje katalize (Gupta i sur. 2014).

U drugoj fazi, sintetiziraju se PC iz GSH pomoću enzima fitokelatin-sintaze (PCS), kojemu je potreban teški metal za aktivaciju (Grill i sur. 1989). PCS pripada porodici cisteinskih proteaza koje uklanjaju aminokiselinu Gly s GSH, katalitičkim mehanizmom s pomoću katalitičke trijade Cys – His – Asp. Većina eukariotskih enzima PCS sastoji se od dvije domene, od N-terminalne domene, odnosno katalitičke domene i C-terminalne domene koja ima ulogu u regulaciji aktivnosti enzima pomoću metalnog iona. Nasuprot tome, većina prokariotskih enzima PCS sastoji se samo od N-terminalnog kraja (Cobbett i Goldsbrough 2002). Dokazano je da je Cd najučinkovitiji aktivator PCS-a, dok ga ostali teški metali aktiviraju manjom učinkovitošću. Sam proces katalize dijeli se u dvije faze. Prva faza je faza aktivacije prilikom koje prisutnost iona Cd u mediju prepoznaje C-terminalna domena enzima PCS te dolazi do spajanja iona Cd i Cys ostatka u posebnu prostornu strukturu. Druga faza je katalitička faza koju provodi N-terminalna domena. U katalitičkoj fazi dolazi do prijenosa ostatka γ -Glu-Cys molekule GSH na drugu molekulu GSH ili na već postojeću molekulu PC-a kako bi nastao produkta PC (Liu i sur. 2015) (Slika 3.).



Slika 2. Sinteza fitokelatina. Enzim γ -glutamilcistein-sintaza (GSH1) katalizira stvaranje peptidne veze između aminokiselina Glu i Cys čime nastaje dipeptid γ -glutamilcistein (γ -Glu-Cys). Enzim glutation-sintaza (GSH2) katalizira povezivanje karboksilne skupine γ -Glu-Cys i amino-skupine Gly, pri čemu nastaje glutation. Iz glutationa nastaje fitokelatin pomoću enzima fitokelatin sintaze (PCS) (preuzeto i prilagođeno prema Merlos i sur. 2014).



Slika 3. Reakcijski koraci PCS-a (preuzeto i prilagođeno prema Rigouin i sur. 2013.)

3.1. GENI FITOKELATIN-SINTAZE

Unatoč identifikaciji aktivnosti PCS-a, identifikacija odgovarajućeg gena ostala je nepoznata sve do kraja prošlog stoljeća. Gene PCS izolirale su tri nezavisne istraživačke skupine, skoro pa istovremeno. Vatamaniuk i suradnici (1999) identificirali su cDNA iz uročnjaka, i nazvali je genom *AtPCS1*. Ekspresija gena *AtPCS1* u mutantima pivskog kvasca *yap1* i *yfc1* potisnula je fenotip osjetljivosti na Cd što upućuje na ulogu ovog gena u uklanjanju Cd. Gen *YAPI* kodira transkripcijski faktor potreban za ekspresiju gena *YFC1*, koji pak kodira transporter odgovoran za izdvajanje kompleksa GSH-Cd u vakuolu. Clemens i suradnici (1999) identificirali su cDNA pšenice, *TaPCS1*, uslijed čije je ekspresije u pivskom kvascu došlo do povećanja otpornosti na Cd baš kao i uslijed ekspresije gena *AtPCS1*. Treća skupina je identificirala *AtPCS1* putem pozicijskog kloniranja *CAD1* gena uročnjaka. Mutanti *cad1* bili su osjetljiviji na Cd i imali su smanjenu sintezu PC-a *in vivo* kao i nedostatak aktivnosti PCS *in vitro*, što je pokazalo kako gen *CAD1* kodira PCS. Pretraživanjem baze podataka tih skupina također je otkriven gen *SpPCS* u kvascu *S. pombe* koji je homologan *AtPCS1* genu. Analizom sekvenci aminokiselina kodiranih genima *AtPCS1*, *TaPCS1* i *SpPCS* utvrđena je konzerviranost N-terminalne regije enzima, dok je C-terminalna regija promijenjiva. Kasnije su izolirani još mnogi geni iz različitih biljaka, tako je gen *PvPCS1* izoliran iz biljke *Pteris vittata*, gen *CdPCS1* iz biljke prstasti trosak (*Cynodon dactylon*), te su geni *LjPCS2* i *LjPCS3* nađeni u biljci *Lotus japonicus* (Pal i sur. 2009).

3.2. REGULACIJA SINTEZE FITOKELATINA

Velik broj znanstvenika svoja je istraživanja posvetio proučavanju regulacije sinteze PC-a. Trenutno su opisane dvije ključne strategije za reguliranje sinteze PC-a, a odnose se na reguliranje biosinteze GSH, te reguliranje aktivnosti PCS-a.

Utvrđeno je kako unutarstanična razina GSH regulira sintezu PC-a, a sinteza GSH može biti regulirana oksidacijskim stresom. Sinteza PC-a i tolerancija na Cd povećavaju se kod transgenih biljaka gorušica (*Brassica juncea*) u kojoj su enzimi biosintetskog puta GSH, GSH1 ili GSH2, prekomjerno ekspimirani, što je ukazalo na važnost reguliranja sinteze GSH kod moduliranja ekspresije PC-a. Enzim GSH2 određuje brzinu biosinteze GSH i PC-a u prisutnosti Cd (Zhu i sur. 1999). Sukladno tome, utvrđeno je povećanje GSH1 i GSH2 u uročnjaku, kada su biljke bile izložene Cd i Cu (Xiang i Oliver 1998). Tehnologijom rekombinantne DNA, gen *gshI*, koji kodira enzim GSH1, iz *Escherichia coli*, prekomjerno

je eksprimiran u gorušici. Kao rezultat prekomjerne ekspresije, transgene su biljke pokazale veću toleranciju na Cd, te imale veću koncentraciju PC-a, dipeptida γ -Glu-Cys i GSH u odnosu na biljke divljeg tipa (Zhu i sur. 1999). Također, prilikom induciranja korijenja gorušice Cd, sinteza PC-a je u uzajamnoj vezi s povećanjem ekspresije gena koji su uključeni u sintezu GSH. Prema tome, regulacija sinteze PC-a može se postići regulacijom aktivnosti enzima GSH1 (Schäfer i sur. 1998).

Drugi važan način reguliranja sinteze PC-a je regulacijom enzima PCS. Izoelektrična točka PCS-a je blizu pH = 4,8, a optimalna temperatura je 35 °C pri pH = 7,9. Najvažnija aktivacija PCS-e je aktivacija metalnim ionima. Koristeći kulturu biljnih stanica izloženih Cd dokazano je da se sinteza PC odvija u roku od nekoliko minuta te da je neovisna o *de novo* sintetiziranim proteinima, što je u skladu s aktivacijom enzima *in vitro*. Enzim je eksprimiran u kulturi biljnih stanica i biljkama uzgajanima na umjetnom mediju ili tlu u prisutnosti esencijalnih teških metala (Cobbett 2001). Na temelju istraživanja Vatamaniuk i suradnika (2000) donešena su dva zaključka. Prvo, katalitičke reakcije PCS nisu isključivo ovisne o keliranju teških metala jer GSH i kompleksi PC-a su aktivni ukoliko sadrže teški metal kao supstrat. Do terminacije dolazi zbog nedostatka raspoloživosti teških metala, te dolazi do natjecanja slobodnih tiola (GSH i PC-a) s ostalim tiolima za visoko afinitetno mjesto sinteze. Drugo, iskorištenje AtPCS1-FLAG teških metalnih tiola kao supstrata ne zahtjeva povećanje koncentracije slobodnih citosolnih iona za povećanu sintezu PC-a. S obzirom na visoke vrijednosti stabilnih kompleksa teški metal - GSH i činjenicu da prevladava koncentracija GSH, metali koji dospijevaju u citosol brzo se prevode u odgovarajući tiol. Formirani GSH tioli, zbog umjereno visoke koncentracije i ekspresije gena PCS, mogu biti uključeni u nastanak PC-a koji također vežu teške metale, ali višom skolonošću.

3.3. ČIMBENICI KOJI UTJEČU NA SINTEZU FITOKELATINA

3.3.1. VRSTE TEŠKIH METALA

Na biosintezu PC-a mogu utjecati različite vrste teških metala. Iako većina teških metala mogu inducirati sintezu PC-a *in vivo*, samo nekoliko teških metala mogu formirati stabilan kompleksni spoj s PC-om. Poznato je kako egzogeno dodano Pb može potaknuti jaču stimulaciju sinteze PC-a u stanicama algi *Chlorella vulgaris*. Genetički modificirane biljke uročnjaka koje su izložene visokim razinama iona Cd mogu brzo stvoriti PC-e, ali

brojnost PC-a se smanjuje ili čak nestaje sa smanjenjem koncentracije metala. Kad su biljke inducirane metalima Cd i Hg najviše se sintetizira PC-a, dok se pod utjecajem (arsena) As sintetiziraju uglavnom manji tioli poput GSH i γ -Glu-Cys, što potkrjepljuje činjenicu da se PC sintetiziraju različitim brzinama ovisno o vrsti metala kao izvoru stresa (Liu i sur. 2015).

3.3.2. KONCENTRACIJA TEŠKIH METALA

Koncentracija teških metala također može utjecati na sintezu PC-a. Tako se PC značajno induciraju kada je koncentracija Cd u korijenju 10 μ M, a u manjoj mjeri se pojavljuju kada ta koncentracija iznosi 50 μ M, što može biti povezano sa smanjenom razinom GSH pri tim koncentracijama. Međutim, učinkovitost vezanja PC-a u algama *Nitzschia palei* je veća s izlaganjem povećanim koncentracijama Cd (Figueira i sur. 2014). PC mogu nastati u tkivu lista, stabljici i korijenu žednjaka (*Sedum alfredii*) nakon izlaganja Cd koncentracije 400 μ M, dok pri izloženosti Pb koncentracije 700 μ M nastaju samo u stabljici i korijenu. Međutim, prisutnost PC-a nije zabilježena nakon izlaganja Zn koncentracije 1600 μ M. Osim koncentracije teških metala, za pojavu PC-a, također je bitan i postojeći oblik teških metala (Liu i sur. 2015).

3.3.3 VRSTA I UVJETI UZGOJA BILJKE

Sinteza PC-a povezana je s vrstom i uvjetima uzgoja biljke. Pod utjecajem stresa uzrokovanog As, ukupna koncentracija PC-a u biljkama ide redoslijedom pirika (*Agropyron repens*) > ljulj (*Lolium perenne*) > pustenasta srčenica (*Leonurus marrubiastrum*) > kukuruz (*Zea mays*) > puzava dobričica (*Glechoma hederacea*) > obična kopriiva (*Urtica dioica*). Kod stresa izazvanog Hg, vodene biljke *Hydrilla verticillata* i *Vallisneria spiralis* sintetiziraju različite tipove PC-a koji se vežu za akumuliranu živu te imaju visoku razinu cisteinskih i neproteinskih tiola. Unatoč većoj toleranciji biljke *H. verticillata* na Hg, biljke *V. spiralis* imaju veću količinu sintetiziranog PC-a u odnosu na biljke *H. verticillata*. Primjenom teških metala na suspenziju biljnih stanica pušine (*Silene vulgaris*) i rajčice kao i na cijele biljke potiče se stvaranje kompleksa između PC-a i teških metala Cu i Cd, kao i vezanje Pb i Zn za tvari manje molekularne težine. Stanice pušine mogu tolerirati 5 do 10 puta veće koncentracije Cu, Cd, Zn i Pb u odnosu na stanice rajčice. Genetički modificiran uročnjak sadrži 2 do 10 puta više Cd u obliku kompleksa Cd-PC, nego odgovarajući divlji tip biljke u svojim korijenima i izdancima.

Čimbenici poput pH, količine svjetlosti i temperature, također mogu utjecati na sintezu PC-a. Tako je, na primjer veća količina PC-a zabilježena pri pH = 6,8, u odnosu na lužnati pH. Razlog tome, na primjer mogla bi biti bolja dostupnost Zn u algama nakon zakiseljavanja vode, zbog promjene kemijske specijacije Zn (Pawlik-Skowronska 2001). Na svjetlu i pri većim temperaturama povećana je proizvodnja PC-a u odnosu na niže temperature i mrak. Povećana proizvodnja PC-a pri višim temperaturama povezana je s optimalnom temperaturom enzima PCS (35°C), dok je smanjena sinteza PC-a u mraku i pri nižim temperaturama povezana sa smanjenom stopom ostalih staničnih procesa, kao što je smanjeni transport Cd koji dovodi do manje potrebe za sintezom PC-a (Liu i sur. 2015).

4. FUNKCIJA FITOKELATINA

Cd i As pojavili su se nedavno u okolišu kao posljedica ljudskih aktivnosti, ponajviše zbog zagađenja ili korištenja fosfatnih goriva. Temeljeno na pretpostavci da većina organizama ili čak organela kod kojih pronalazimo PC nije bila nikada izložena takvim toksinima, predložena su tri moguća objašnjenja za pojavu PC-a. Prvo objašnjenje je da PC imaju važnu ulogu u regulaciji homeostaze esencijalnih metala. Druga teorija je da enzim PCS služi u drugim, za sada nepoznatim, esencijalnim funkcijama, i posljednja teorija je da su Cd i As esencijalni metali te da je put PC-a dio mreže za homeostazu navedenih metala (Clemens i Persoh 2009).

4.1. POVEĆANJE OTPORNOSTI BILJAKA NA TEŠKE METALE I DETOKSIKACIJA TEŠKIH METALA

Budući da su imobilizirani metali manje toksični od slobodnih metalnih iona, PC se smatraju važnim dijelom mehanizma detoksikacije teških metala u višim biljkama. PC su peptidi koji sudjeluju u keliranju teških metala i detoksikaciji biljaka i gljivica. Tako je Cd keliran s PC-om jedan od važnijih rezultirajućih peptidnih kompleksa. Stvaranje kompleksa metalnih iona i PC-a jedan je od načina povećanja otpornosti biljaka prema teškim metalima, što upućuje na značajnu ulogu PC-a u zaštiti biljaka od teških metala. Postoji i mnogo genetičkih dokaza o ulozi PC-a u detoksikaciji Cd. U kvašćevim stanicama izloženim Cd, opisana su dva različita oblika metalnog kompleksa PC-a koji se međusobno razlikuju u molekularnoj težini, a nazivaju se kompleksima niske (LMW) ili i visoke (HMW) molekularne težine (Liu i sur. 2015). Nazivi su uglavnom temeljeni na njihovoj migraciji tijekom gel-filtracije (Rauser 1995). Molekularna težina LMW kompleksa PC-a iznosi od 3

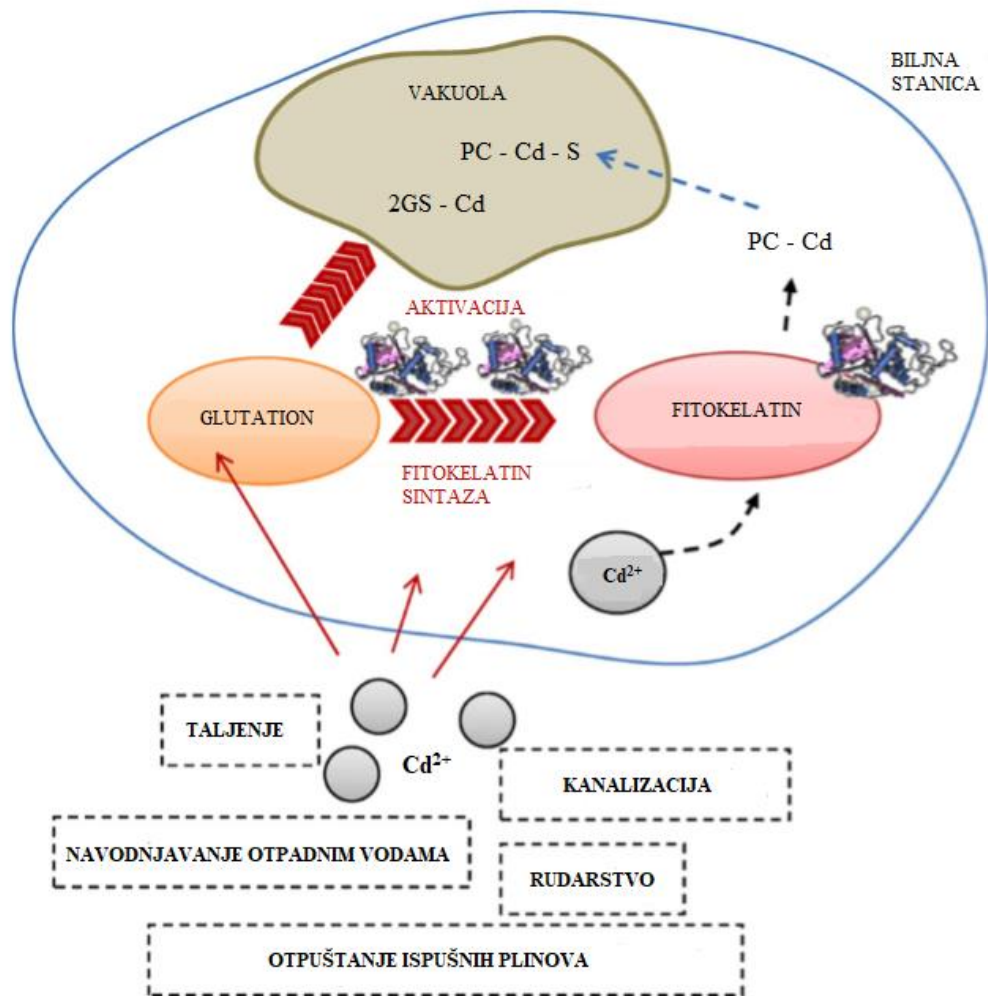
do 4 kDa i sastoji se uglavnom samo od PC-a i Cd, dok HMW kompleks PC-a ima molekularnu težinu od 6 do 9 kDa, te osim PC i Cd sadrži i sulfide. Sulfidni ioni imaju važnu ulogu u detoksikaciji Cd pomoću PC-a, omogućavaju bolju stabilnost kompleksa i povećavaju količinu vezanog Cd po molekuli (Liu i sur. 2015).

Glavna uloga PC-a u toleranciji na Cd je privremeno vezanje iona Cd u citosolu. Izloženost ionima Cd aktivira se enzim PCS uslijed čega dolazi do povećane sinteze PC-a u citosolu. Cd se veže na nastale molekule PC-a, pri čemu nastaje kompleks PC-Cd koji se prenosi u vakuolu, i koji je značajan za toleranciju organizma na Cd (Slika 4) (Liu i sur. 2015).

Usprkos brojnim dokazima koji ukazuju na ulogu PC-a u biljnim odgovorima na teške metale i u detoksikaciji istih, također su odgovorni i za razvijanje preosjetljivosti na teške metale. U transgenim biljkama, prekomjerne količine PC-a pomažu akumulirati veće količine teških metala, bez razvoja tolerancije i pojave preosjetljivosti na teške metale (Gupta i sur. 2014).

4.2. ODRŽAVANJE HOMEOSTAZE METALNIH IONA

PC su uključeni u homeostazu metalnih iona u biljkama regulirajući dostupnost metalnih iona u biljnoj stanici. Homeostaza metalnih iona zahtjeva stvaranje unutarstaničnog kompleksa metala kada postoji stanični suvišak te kasnije oslobađanje metala apoproteinima kojima su potrebni, ili pak može doći do konačnog skladištenja metala unutar stanice. Prema tome, PC imaju dvostruku ulogu: stvaranje kompleksa PC-metal za inaktivaciju metala i njihovo skladištenje u vakuoli, te prijenos esencijalnih metala na novosintetizirane apoenzime. U višestaničnim organizmima metalni ioni moraju biti smješteni u točno određene stanice, tkiva i organe koji su udaljeni od mjesta preuzimanja, bez usputnog akumuliraju na nekim drugim mjestima. Bitni procesi u homeostazi uključuju: dobro kontrolirani transport metalnih iona preko membrane, keliranje pomoću molekula male molekularne težine i isporuku točno određenim proteinama (Liu i sur. 2015).



Slika 4. Mehanizam detoksikacije pomoću fitokelatina (PC) na primjeru Cd. Izloženost ionima Cd aktivira se enzim fitokelatin-sintaza uslijed čega dolazi do povećane sinteze PC-a u citosolu. Cd se veže na nastale molekule PC-a, pri čemu nastaje kompleks PC-Cd koji se prenosi u vakuolu (preuzeto i prilagođeno prema Zitka i sur. 2011).

4.3. ULOGA FITOKELATINA U METABOLIZMU SUMPORA TIJEKOM STRESA UZROKOVANOG TEŠKIM METALIMA

Sumpor (S) je esencijalan i značajan element za sve žive organizme, uključen u mnoge biokemijske i fiziološke procese. Sastavni je dio dviju važnih aminokiselina, Cys i metionina (Met), mnogih proteina, heteropolisaharida, lipida, klastera Fe-S te različitih drugih biomolekula kao što su vitamini, kofaktori, peptidi i sekundarni metaboliti. U biološkim sustavima odgovoran je za katalitička i biokemijska svojstva različitih

biomolekula. Na primjer, zbog nukleofilnosti sulfhidrilne skupine koju posjeduje aminokiselina Cys, mnogi tioli imaju sposobnost reakcije sa širokim spektrom posrednika, poput citotoksičnih elektrofilnih organskih ksenobiotika, teških metala, slobodnih radikala i slično. Dva tiola u disulfidu mogu biti uključena u redoks reakcije. Zbog puferskog djelovanja u mnogim redoks reakcijama, kao i zbog sposobnosti reagiranja s elektrofilnim tvarima, GSH je direktno uključen u regulaciju metabolizma i raspodjelu S u organima. Kao što je već spomenuto, GSH je prekursor u sintezi PC-a, te je stoga i sinteza GSH i PC-a regulirana aktivnostima koje koriste Cys, što može doprinijeti opisivanju cjelokupnog zahtjeva biljaka za S. Zahtjev za S obično varira sukladno s različitim uvjetima okoliša, biotičkim i abiotičkim stresovima, uključujući i teške metale. Direktna poveznica može se uočiti kada smanjenim uzimanjem S iz rastućeg medija dođe do dramatičnog smanjenja S, GSH i Cys u biljnim tkivima (Gupta i sur. 2014).

5. METODE ODREĐIVANJA FITOKELATINA

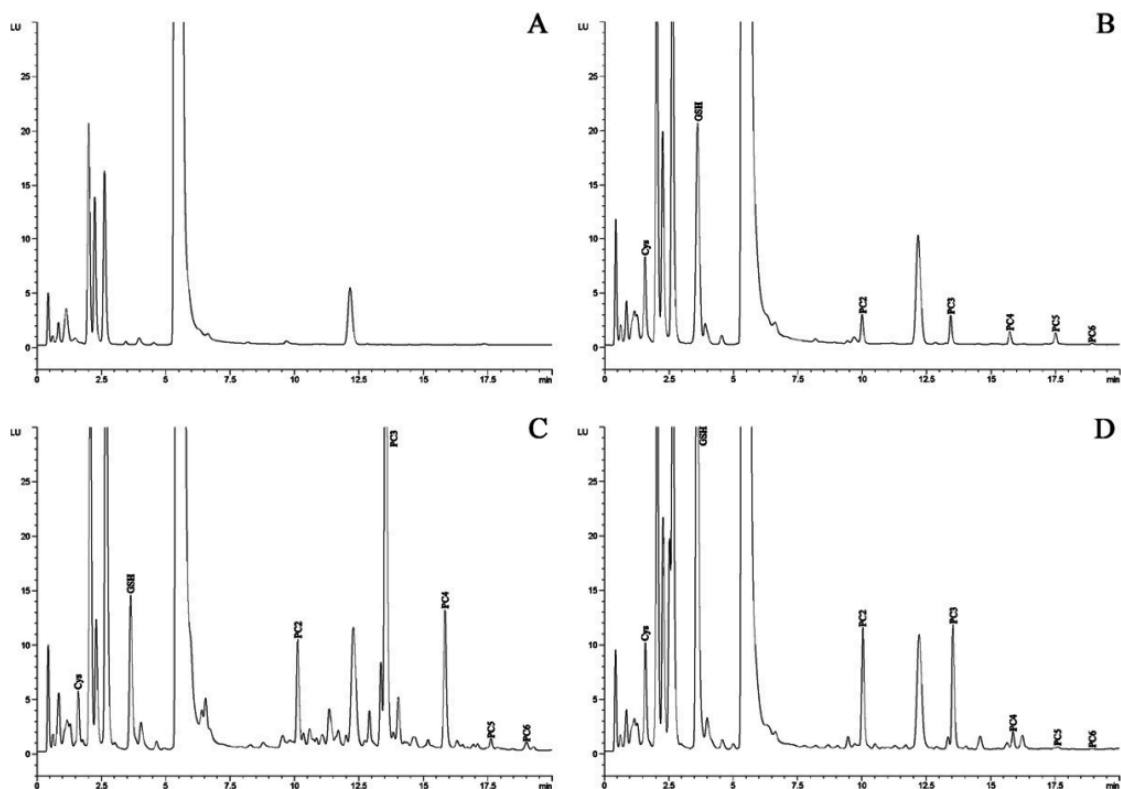
5.1. VISOKOTLAČNA TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA

Razina PC-a u tkivu najčešće se određuje pomoću visokotlačne tekućinske kromatografije (HPLC). Tekućinska kromatografija pod visokim tlakom je fizikalna metoda koja se koristi za analizu i razdvajanje smjesa čiji se sastojci raspodjeljuju između dvije faze, mobilne i stacionarne, pod utjecajem visokog tlaka.

Postupak određivanja PC-a analizom s pomoću HPLC-a je vrlo skup jer zahtjeva primjenu fluorescentno označenih supstrata ili pročišćavanje koje iziskuje puno strpljenja i truda (Zitka i sur. 2011). Peptidi se odvajaju na stupcu obrnute faze. U jednom determinacijskom sustavu, 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzojeva kiselina) (DTNB) reagira s tiolnom skupinom na ciljanoj molekuli kako bi se proizveo anion 2-nitro-5-tiobenzoat koji se mjeri na osnovi molarnog ekstinkcijskog koeficijenta ($14,150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) pri apsorpcijskom maksimumu od 412 nm. Upotrebom DTNB-a kao reagensa, te nakon odvajanja peptida na kromatografskom stupcu, uspješno se mogu kvantificirati PC i GSH. Nadalje, peptidi mogu biti i fluorescentno označeni prije razdvajanja, pomoću 3,7-dimetil-4-bromometil-6-metil-1,5-diazabiciklo-(3,3,3)-okta-3,6-dien-2,8-dion (mBBr). Metoda označavanja s mBBr-om je osjetljivija od DTNB metode, međutim ako postoji višak GSH u ispitivanoj otopini to može dovesti do neučinkovitog označavanja PC-a mBBr-om. Stoga je

DTNB metoda prihvatljivija za ispitivanje aktivnosti PCS. Također, mBBr metoda se ne može primijeniti nakon HPLC-a zbog spore reakcijske brzine mBBr derivata (Ogawa i sur. 2010).

Ju i suradnici (2011) određivali su PC-e u ljulju (*Lolium perenne*) nakon izlaganja stresu uzrokovanog Cd, pomoću metode HPLC s fluorescentnim detektorom. Ekstrakti su pripremani u puferu koji sadrži 0,1% TFA i 5 mmol L⁻¹ dietilenetriaminpentaoctenu kiselinu (DTPA). Za kalibraciju su korišteni standardi Cys, GSH i PC2 – 6, koji su pripremljeni ekstrakcijskom puferu u različitim koncentracijama. Uzroci se mogu i pohraniti na -80 °C, nakon smrzavanja u tekućim dušikom. Ekstrakcija tiola se vrši pomoću pufera za ekstrakciju, nakon čega slijedi centrifugiranje homogenata 10 minuta na 12 000 g, pri 4 °C. Odvojeni supernatant pomiješa se s puferom HEBES i otopinom tris(2-karboksietil)fosfinhidroklorida, nakon čega je pohranjen pri sobnoj temperaturi 5 minuta. Derivatizacija se provodi dodavanjem otopine mBBr pripremljene u acetonitrilu, i ponovnim skladištenjem u mraku pri sobnoj temperaturi na 30 minuta. Reakcija se prekida dodavanjem otopine MSA. Derivatizirani uzorci filtrirani su pomoću siringe s 0,20 µm filterom za HPLC analize. Uzorci razdvajani u linearnom gradijentu. Otapalo A bila je otopina 0,1% TFA u vodi, a otapalo B bila je otopina acetonitrila. Ukupno vrijeme analize bilo je 30 minuta. Identifikacija pikova tiolnih derivata izvršena je usporedbom s puferom za ekstrakciju, pojedinačnim standardima i standardima mješavina otopina, a koncentracije tiola izračunate su pomoću odnosa između koncentracija tiola u standardnim otopinama i odgovarajućom visinom pika (Slika 5).



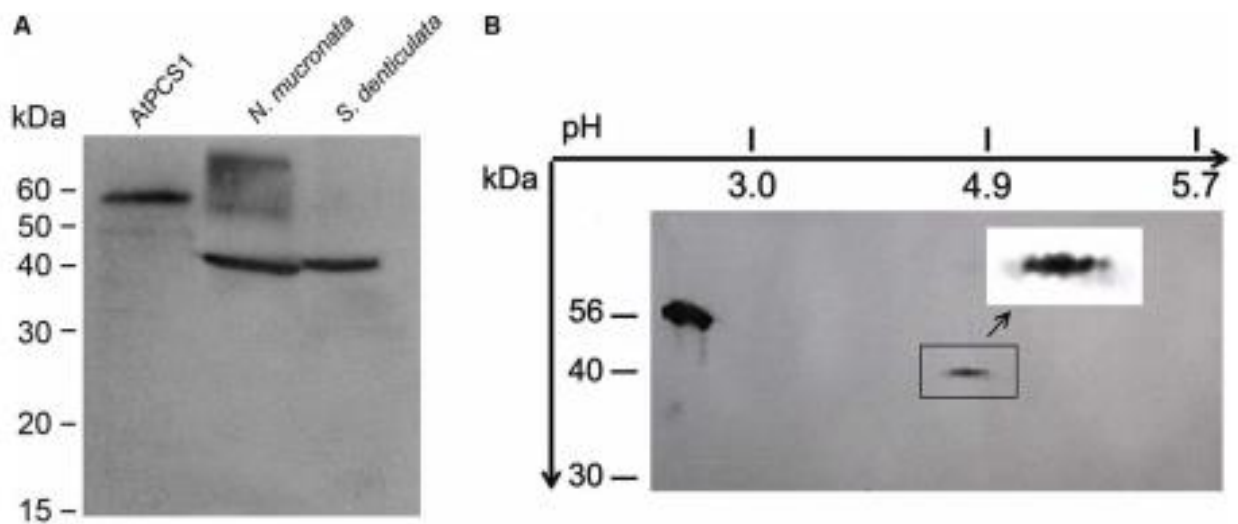
Slika 5. Kromatogrami dobiveni iz pufera za ekstrakciju (A), standardnih miješavina tiola (B), ekstrakta korijenja (C) i listova (D) nakon izloženosti stresu uslijed tretmana Cd tijekom 9 dana.

5.2. WESTERN BLOT ANALIZA FITOKELATIN-SINTAZE

Osim HPLC-a koriste se i druge metode. Jedna od njih je Western blot analiza ili imunoblot. Kod te metode proteini se razdvajaju prema veličini SDS-poliakrilamidnom gel-elektroforezom (SDS-PAGE) u kojoj su oni otopljeni u otopini koja sadržava negativno nabijeni detergent natrij-dodecilsulfat (SDS). Na svaki se protein veže velik broj molekula detergenta koje ga denaturiraju i daju mu ukupni negativni naboj. Pod tim uvjetima svi proteini putuju prema pozitivnoj elektrodi, a brzina putovanja određena je njihovom veličinom. Nakon elektroforeze proteini se prenose na membranu. Membrana se inkubira s protutijelima koja prepoznaju protein od interesa, a vezana protutijela moguće je detektirati reakcijom na različite reagense (Copper i Hausman 2010).

Fontanina i suradnici (2018) koristeći se Western blot analizom m detektirali su PCS u algama *Nitella mucronata*. Ukupni sadržaj proteina određivan je metodom po Bradfordu, gdje se kao standard koristi goveđi serumski albumin. Potom je provedena jednodimenzionalna (1D) i dvodimenzijalna (2D) Western blot analiza. Kod 1D

eлектроforeze, 18 μg uzorka nanešeno je u jažice na 12% SDS-poliakrilamidnog gela, koji su preneseni na nitroceluloznu membranu tijekom 60 min na 100V. Prijenos ekstrakta proteina potvrđen je *Ponceau-S* bojanjem. Za 2D elektroforezu ekstrakti proteina istaloženi su trikloroocetnom kiselinom/acetonom, a zatim su ponovno suspendirani u rehidracijskom puferu. Uzimano je 125 μg uzorka proteina. Gelovi su obojani SYPRO bojom. Nakon digitalizacije slike, gelovi su uronjeni u pufer Laemmli 20 minuta i zatim isprani puferom za prijenos. Proteini su prenešeni na nitroceluloznu membranu. Za analizu 1D i 2D metode imunoreaktivnost je analizirana s poliklonalnim protutijelom. Membrane se inkubiraju sa sekundarnim protutijelom pri razrijeđenju 1:5000, tijekom jednog sata. Aktivnost peroksidaze razvijena je pomoću reagensa ECL. U 1D Western blot metodi ekstrakti alge *N. mucronata* pokazali su signal PCS s molekulskom masom od približno 40 kDa. U 2D Western blot metodi također se pojavio signal PCS s istom molekulskom masom (Slika 6).



Slika 6. A - 1D Western blot, PCS bend iz alge *N. mucronata* uspoređen PCS bendom iz biljke *Selaginella denticulata* i AtPCS1 iz uočnjaka. B – 2D Western blot, višestruka pojava PCS signala oko 40 kDa. Preuzeto od Fontanini i sur. 2018.

6. ZAKLJUČAK

Stres prouzročen teškim metalima jedan je od glavnih problema koji utječu na proizvodnju biljaka. Biljke pokazuju razlike u rezistentnosti na teške metale. Neke biljke uspijevaju na tlima koje sadržavaju visoku količinu toksičnih metala, dok druge ne opstaju u takvim uvjetima. Općenito, stres teškim metalima uzrokuje stvaranje ROS-a što za posljedicu ima nastanak oksidacijskog stresa, koji također negativno utječe na biljku. Glavnu ulogu u smanjenju oksidacijskog stresa ima GSH, dok PC imaju ulogu u detoksikaciji teških metala. U posljednjih nekoliko godina postignut je značajan napredak u proučavanju biosinteze, ekspresije, regulacije i funkcije PC-a. Brojna su istraživanja pomogla u shvaćanju mehanizama keliranja metala i njihove ugradnje u biljnu stanicu. Napretkom tehnologije došlo je do mogućnosti ugradnje gena za PCS u biljke kako bi se omogućila veća tolerancija na kontaminaciju teškim metalima u okolišu. Takvim se postupcima proizvodnja i uspješnost poljoprivrede poboljšava. Geni za PCS pronađeni su u nekim životinjskim organizmima, te se buduća istraživanja usmjeravaju na otkriće njihovih funkcija u životinjama, ne samo biljkama.

7. LITERATURA

- Clemens, S., Kim, E.J., Neumann, D., Schroeder, J.I. (1999) Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *The EMBO Journal* 18: 3325-3333
- Clemens, S., Pershov, D. (2009) Multi-tasking phytochelatin synthases. *Plant science* 177: 266-271
- Cobbett, C. (2001) Heavy Metal Detoxification in Plants: Phytochelatin Biosynthesis and Function. *IUBMB Life* 51: 183-188
- Cobbett, C., Goldsbrough, P. (2002) Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology* 53: 159-182
- Cooper, G. M., Hausman R. E. (2010) *Stanica-Molekularni pristup*. 5.izdanje, Zagreb, Medicinska naklada.
- Figuerira, E., Freitas, R., Guasch, H., Almeida S. F. (2014) Efficiency of cadmium chelation by phytochelatins in *Nitzschia palea* (Kützing) W. Smith. *Ecotoxicology* 23: 285-292
- Fontanini, D., Andreucci, A., Castiglione, M. R., Basile, A., Sorbo, S., Petraglia, A., Degola, F., Bellini, E., Bruno, L., Varotto, C., Topp, L. S. (2018) The phytochelatin synthase from *Nitella mucronata* (Charophyta) plays a role in the homeostatic control of iron(II)/(III). *Plant Physiology and Biochemistry* 127: 88-96
- Grill, E., Löffler, S., Winnacker, E. L., Zenk, M. H. (1989) Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific gamma-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 6838-6842
- Gupta, D. K., Vandenhove, H., Inouhe, M. (2014) Role of phytochelatins in heavy metal stress and detoxification mechanisms in plants. U : Gupta, D. K., Corpas, F. J., Palma, J. M. (ur.) *Heavy Metal Stress in Plants*. Springer, Berlin, str. 73-94.
- Ju, X. H., Tang, S., Jia, Y., Guo, J., Ding, Y., Song, Z., Zhao, Y. (2011) Determination and characterization of cysteine, glutathione and phytochelatins (PC2–6) in *Lolium perenne* L.

exposed to Cd stress under ambient and elevated carbon dioxide using HPLC with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B* 879: 1717-1724

Kondo, N., Imai, K., Isobe, M., Goto, T., Murasugi, A., Wada-Nakagawa, C., Hayashi, Y. (1984) Cadystin a and b, major unit peptides comprising cadmium binding peptides induced in a fission yeast - separation, revision of structures and synthesis. *Tetrahedron Letters* 25: 3869-3872

Liu, W., Zhang, X., Liang, L., Chen, C., Wei, S., Zhou, Q. (2015) Phytochelatin and oxidative stress under heavy metal stress tolerance in plants. U: Gupta, D. K., Palma, J. M., Corpas, F. J. (ur.) *Reactive Oxygen Species and Oxidative Damage in Plants Under Stress*. Springer, Switzerland, str. 191-217.

Merlos, M. A., Michálek, P., Kryštofová, O., Zítka, O., Adam, V., Kizek, R. (2014) The role of phytochelatins in plant and animals: A review. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies* 4: 22-27

Murasugi, A., Chiaki, W., Hayashi, Y. (1981) Cadmium-binding peptide induced in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Biochemistry* 90: 1561-1565

Ogawa, S., Yoshidomi, T., Shirabe, T., Yoshimura, E. (2010) HPLC method for the determination of phytochelatin synthase activity specific for soft metal ion chelators. *Journal of Inorganic Biochemistry* 104: 442-445

Pal, R., Rai, J. P.N. (2009) Phytochelatins: Peptides Involved in Heavy Metal Detoxification. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160: 945-963

Pawlik-Skowronska, B. (2001) Phytochelatin production in freshwater algae *Stigeoclonium* in response to heavy metals contained in mining water; effects of some environmental factors. *Aquatic Toxicology* 52: 241-249

Rausser, W. E. (1995) Phytochelatins and Related Peptides: Structure, Biosynthesis, and Function. *Plant physiology* 109: 1141-1149

Schäfer, H. J., Haag-Kerwer, A., Rausch, T. (1998) cDNA cloning and expression analysis of genes encoding GSH synthesis in roots of the heavy-metal accumulator *Brassica juncea* L.: evidence for Cd-induction of a putative mitochondrial gamma-glutamylcysteine synthetase isoform. *Plant Molecular Biology* 37: 87-97

- Steffens, J. C. (1990) The heavy-metal binding peptides of plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 41: 553-575
- Vatamaniuk, O. K., Mari, S., Lu, Y. P., Rea, P. A. (1999) AtPCS1, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis*: Isolation and in vitro reconstitution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 7110-7115
- Vatamaniuk, O. K., Mari, S., Lu, Y. P., Rea, P. A. (2000) Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase: blocked thiols are sufficient for PC synthase-catalyzed transpeptidation of glutathione and related thiol peptides. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 31451-31459
- Xiang, C., Oliver, D. J. (1998) Glutathione Metabolic Genes Coordinately Respond to Heavy Metals and Jasmonic Acid in *Arabidopsis*. *The plant cell* 10: 1539-1550
- Xiang, C., Werner, B. L., Christensen, E. M., Oliver, D. J. (2001) The Biological Functions of Glutathione Revisited in *Arabidopsis* Transgenic Plants with Altered Glutathione Levels. *Plant Physiology* 126: 564-574
- Zhu, Y. L., Pilon-Smits, E. A., Jouanin, L., Terry, N. (1999) Overexpression of Glutathione Synthetase in Indian Mustard Enhances Cadmium Accumulation and Tolerance. *Plant Physiology* 119: 73-80
- Zhou, Q., Song, Y. (2004) *Remediation of Contaminated Soils: Principles and Methods*. Science Press
- Zitka, O., Krystofova, O., Soborova, P., Adam, V., Zehnalek, J., Beklova, M., Kizek, R. (2011) Phytochelatin synthase activity as a marker of metal pollution. *Journal of Hazardous Materials* 192: 794-800
- .